

# Složení proteinu krmných kvasnic kultivovaných při zvýšených teplotách

663.14:636.087 547.96

Dr. LUBOMÍR ADÁMEK, Ing. FRANTIŠEK ŠTROS, CSc., Ing. MILOSLAV RUT, Ing. JOHANNA RYBÁŘOVÁ, CSc., Výzkumný ústav krmivářského průmyslu a služeb, Pečky, pracoviště Praha

Kultivace kvasinek na médiu se syntetickým etanolem je proces značně exothermní. Při produkci 1 kg kvasničné hmoty se uvolňuje 20–30 MJ metabolického tepla [1], které je nutno neustále odvádět systémem chladicího zařízení. Při nedostatku chladicí vody, zejména v letních měsících, se překračuje optimální interval kultivační teploty a tím se snižuje intenzita růstu kvasinek, výtěžnostní koeficient i kvalita konečného produktu [2, 3, 4, 5, 6].

Množství chladicí vody i nároky na přestup tepla výměníků stoupají s klesající kultivační teplotou. Například při zvýšení kultivační teploty ze 33 na 34 °C je možno ušetřit 11–15 % chladicí vody [1]. Uvážíme-li, že provozní náklady na proces chlazení závodu na výrobu krmných kvasnic ze syntetického etanolu s roční kapacitou 40 000 tun představují více než 10,5 miliónů Kčs, je zřejmé, že jakékoliv zvýšení kultivační teploty při zachování dynamiky růstu, produkce a kvality výrobku představuje významné úspory.

U nově izolovaných producentů krmných kvasnic *Torulopsis ethanolitolerans* 235 a *Candida utilis* 231 bylo pomocí „feed batch“ kultivací zjištěno, že je možno kultivační teplotu bez pronikavých změn růstové rychlosti, výtěžnosti a kvality vyrobené biomasy zvýšit ze 30 °C až na 35 °C a v případě kmene 235 až na 37 °C [6]. K ověření těchto získaných poznatků byl proto proveden podrobnější rozbor složení aminokyselin vyprodukované biomasy.

## MATERIÁL A METODY

### Mikroorganismus

Srovnávací pokus vlivu zvýšených kultivačních teplot byl proveden u dvou kmenů kvasinek, producentů krmných kvasnic, *Torulopsis ethanolitolerans* RIFIS 235 a *Candida utilis* RIFIS 231 [1]. Kmeny byly udržovány a pomnožovány na minerální půdě se syntetickým etanolem běžným postupem [6].

### Příprava kvasničné biomasy pro analýzu

Nakultivovaná biomasa byla z fermentační pudy izolována ve formě kvasničné pasty v komorové odstředivce Westfalia. Pro analytické zpracování biomasy byly připraveny vzorky sušených kvasnic takto: izolovaná kvasničná biomasa byla resuspendována malým množstvím vodovodní vody a po dobu 30 min termolizována při 70 °C. Kvasničná suspenze byla potom usušena v laboratorní rozprašovací sušárně.

### Hodnocení sušených vzorků

Aminokyseliny byly stanoveny na automatickém analyzátoru aminokyselin po kyselé hydrolýze v zatavené ampuli pod dusíkem, 4 h při 105 °C.

Vzorky na stanovení threoninu a serinu byly analyzovány po 10hodinové kyselé hydrolýze sušených vzorků při 125 °C pod zpětným chladičem.

Množství čistých bílkovin bylo vypočteno z obsahu aminokyselin v biomase [8].

Vztah mezi kultivační teplotou a obsahem aminokyselin byl zkoumán metodou regresní analýzy [9] a závislosti procentního obsahu aminokyselin (AK) na kul-

tivační teplotě [t] byly nahrazeny regresní přímkou  $AK = bt + a$ .

Oprávněnost této regrese byla testována koeficientem korelace *r*.

### Výsledky

Kultivační „feed batch“ pokusy s produkčními kmeny *Torulopsis ethanolitolerans* 235 a *Candida utilis* 231 na minerální půdě se syntetickým etanolem ukázaly, že kultivační teplotu lze zvýšit bez významnějších změn růstových parametrů až na 35 °C a u kmene 235 dokonce až na 37 °C.

Výsledkem těchto pokusů bylo i zjištění, že v podmínkách kultivační teploty 30 °C kultura kvasnice kmene 231 byla nejbohatší na dusíkaté látky, ovšem se zvýšením kultivační teploty se jejich obsah značně snižoval, a to mnohem markantněji, než u druhého hodnoceného kmene 235.

Tabulka 1. Vliv kultivační teploty na obsah aminokyselin v biomase dvou produkčních kmenů kvasinek

Aminokyseliny	Obsah aminokyselin při různých teplotách % v sušině							
	30 °C	35 °C	37 °C	39 °C	30 °C	35 °C	37 °C	39 °C
	Candida utilis 231				Torulopsis ethanolitolerans 235			
Lyzin	4,12	3,74	4,28	3,55	3,87	4,31	4,19	3,96
Histidin	1,66	1,0	1,13	0,90	0,91	0,94	1,13	0,83
Arginin	3,38	2,78	2,98	2,64	2,86	2,79	3,07	2,72
Asparagová kyselina	5,67	5,43	5,15	5,16	5,66	5,34	5,05	5,02
Threonin	2,82	2,67	2,57	2,37	2,59	2,73	2,51	2,64
Serin	2,58	2,52	2,37	2,33	2,36	2,59	2,45	2,54
Glutamová kyselina	7,65	7,40	7,46	7,22	7,40	7,41	7,24	7,0
Prolin	1,65	1,45	1,22	1,25	1,22	1,30	1,20	1,24
Glycin	2,57	2,44	2,13	2,01	2,25	2,53	2,25	2,22
Alanin	4,62	4,30	3,87	3,63	4,09	4,09	3,93	4,01
Valin	3,10	2,77	2,29	2,11	2,59	2,28	2,09	2,02
Izoleucin	1,90	1,80	1,98	1,87	2,30	2,68	2,47	2,39
Leucin	3,83	3,59	3,40	3,23	3,59	3,93	3,69	3,26
Tyrozín	2,05	1,98	1,92	1,78	2,14	2,19	2,02	2,08
Fenylalanin	2,81	2,73	2,66	2,63	2,63	2,55	2,62	2,71

Potvrzením tohoto nálezu je i zjištěný obsah aminokyselin (tabulka 1) a z něho vypočítaná množství čistých bílkovin (tabulka 2).

Bylo stanoveno, že kmen kvasinek *Candida utilis* 231 při 30 °C tvořil 45,57 % čistých bílkovin, oproti 41,77 %, zjištěným ve stejných kultivačních podmínkách u druhého produkčního kmene *Torulopsis ethanolitolerans* 235. Při vyšších teplotách 35–39 °C se tato výhoda kmene ztrácela a množství čistých bílkovin v biomase kvasničné kmene 231 bylo stejné, nebo dokonce o něco nižší než u porovnávaného kmene 235.

U všech analyzovaných vzorků obou kmenů kvasnic v proteinu mají největší zastoupení kyselina glutamová, alanin a lyzin, nejmenší histidin, prolin a izoleucin.

Složení aminokyselin biomasy se měnilo se změnou kultivační teploty a bylo závislé rovněž na produkčním kmenu. U sušených vzorků hodnocených kmenů, připravených za stejných kultivačních podmínek je patrné, že při 30 °C u kvasničného kmene 231 je množství stano-

vovaných aminokyselin vyšší než u kmene 235. Výrazný rozdíl byl zaznamenán hlavně u histidinu, valinu a argininu. Obsah izoleucinu v proteinu kmene 231 byl však nižší. Při vyšších kultivačních teplotách 35–39 °C byl obsah jednotlivých aminokyselin v biomase obou kmenů kvasnic vcelku vyrovnán, pouze s výjimkou izoleucinu.

Tabulka 2. Vliv kultivační teploty na obsah čistých bílkovin u dvou zkoušených produkčních kmenů

Kultivační teplota °C	% čistých bílkovin v sušině	
	Torulopsis ethanolitolerans 235	Candida utilis 231
30	41,77	45,57
35	43,05	42,75
37	41,60	41,61
39	40,47	39,43

Tabulka 3. Směrnice regresních přímek (b) a koeficienty korelace (r) závislosti obsahu jednotlivých aminokyselin na kultivační teplotě v intervalu 30–39 °C

Aminokyseliny	Candida utilis 231		Torulopsis ethanolitolerans 235	
	b	r	b	r
Lyzin	–0,0394	–0,453	0,0180	0,335
Histidin	–0,0807	–0,921	0,0017	0,052
Arginin	–0,0743	–0,892	–0,0031	–0,079
Asparagová kyselina	–0,0617	–0,960	–0,0757	–0,978
Threonin	–0,0466	–0,955	0,0002	0,011
Serin	–0,0288	–0,934	0,0173	0,659
Glutamová kyselina	–0,0421	–0,917	–0,0398	–0,803
Prolin	–0,0727	–0,967	0,0004	0,039
Glycin	–0,0634	–0,937	–0,0041	–0,103
Alanin	–0,1340	–0,989	–0,013	–0,654
Valin	–0,1130	–0,965	–0,0656	–0,994
Izoleucin	0,0010	0,061	0,0121	0,287
Leucin	–0,0658	–0,985	–0,0256	–0,357
Tyrozín	–0,0270	–0,920	–0,0100	–0,524
Fenylalanin	–0,0205	–0,988	0,0146	0,488

Z regresní analýzy závislosti obsahu aminokyselin na kultivační teplotě vyplývá (tabulka 3), že závislost pro kvasničný kmen *Candida utilis* 231 a většinu aminokyselin je lineární, negativní, s vysokým stupněm správnosti odhadu regresní přímky (s výjimkou lyzinu a izoleucinu).

Naproti tomu závislosti v případě kvasničného kmene *Torulopsis ethanolitolerans* 235 nelze přisoudit lineární charakter a z tabulky 1 vyplývá, že se jedná o křivku s maximem 35–37 °C. U kmene 231 ubývá v intervalu 30–39 °C přibližně 0,06 % obsahu aminokyselin na 1 °C, u kmene 235 pouze 0,01 % ve stejném intervalu teplot.

Výsledky analýzy závislosti obsahu aminokyselin na kultivační teplotě potvrzují dřívější zhodnocení termotolerance obou kmenů. Optimální teplota pro tvorbu dusíkatých látek pro *Candida utilis* 235 je 30 °C, pro *Torulopsis ethanolitolerans* 35 °C.

#### Literatura

- [1] ŠTROS, F., VERNEROVÁ, J., RYBÁŘOVÁ, J., REŽÁBKOVÁ, J., RUT, M.: Hodnocení termotolerance kvasinek asimilujících etanol. Závěr. zpráva VÚKPS, Praha, 1980.  
[2] POZMOGOVA, I. N., LOMOVA, J. J.: Prikl. Bioch. Mikrobiol., 2, 1968, s. 505.

- [3] ČISTJAKOVA, T. I., DEDJUCHINA, E. G., JEROŠIN, V. K.: Prikl. Bioch. Mikrobiol., 16, 1980, s. 13.  
[4] EL SHEIKH, I. E. T. A., BERRY, D. R.: Biotechnol. Letters, 2, 1980, s. 105.  
[5] ROSE, A. H., HARRISON, J. S.: The Yeast, Acad. Press, London, 1970.  
[6] ADÁMEK, L., ŠESTÁKOVÁ, M., RYBÁŘOVÁ, J., ŠTROS, F.: Kvas. prům., 27, 1981, s. 278.  
[7] Projektová studie závodu na výrobu krmných kvasnic ze syntetického etylalkoholu 40 000 t/rok. Neratovice, Chemopetrol, koncernový podnik Spolana, Neratovice.  
[8] RYBČUK, V. A., POMAZKOVÁ, V. A., FEDOROVIC, R. M.: Mikrobiol. prom., 11, 1976, s. 3.  
[9] PECHOČ, V.: Vyhodnocování měření a početní metody v chemickém inženýrství, SNTL, Praha, 1961.

Adámek, L. - Štros, F. - Rut, M. - Rybářová, J.: Složení proteinu krmných kvasnic kultivovaných při zvýšených teplotách. Kvas. prům., 28, 1982, č. 8, s. 174–176.

U producentů krmných kvasnic *Torulopsis ethanolitolerans* 235 a *Candida utilis* 231, rostoucích na minerální půdě se syntetickým ethanolom, byl zjišťován vliv kultivační teploty 30–39 °C na obsah jednotlivých aminokyselin v proteinu biomasy.

Bylo zjištěno, že obsah aminokyselin v biomase kvasnic nebyl konstantní a měnil se s kultivačními podmínkami a podle použitého produkčního kmene.

Nejvíce aminokyselin bylo syntetizováno kmenem *Candida utilis* 231 při kultivační teplotě 30 °C. Při zvýšených teplotách obsah aminokyselin v biomase úměrně klesal.

U kmene *Torulopsis ethanolitolerans* 235 nejvyšší biosyntéza aminokyselin probíhala při 35 °C. Při nižší a vyšší teplotě než 35 °C syntéza aminokyselin opět klesala.

Nalezené hodnoty pro optimální biosyntézu aminokyselin odpovídaly optimálním hodnotám kultivačních teplot stanoveným pro růstové parametry zkoušených produkčních kultur.

Ада́мек, Л., Штрос, Ф., Рут, М., Рыбаржова И.: Состав протеина кормовых дрожжей, культивированных при повышенных температурах. Квас. прум., 28, 1982, No. 8, стр. 174–176.

Для продуцентов кормовых дрожжей *Torulopsis ethanolitolerans* 235 и *Candida utilis* 231, выращиваемых на минеральной среде с синтетическим этанолом, определялось влияние температуры культивирования 30–39 °C на содержание отдельных аминокислот в протеине биомассы.

Было установлено, что содержание аминокислот в биомассе дрожжей не являлось постоянным и изменялось в связи с условиями культивирования и в связи с примененным продукционным штаммом.

Больше аминокислот было синтезировано штаммом *Candida utilis* 231 при температуре культивирования 30 °C. При повышенной температуре содержание аминокислот в биомассе пропорционально понижалось.

В случае штамма *Torulopsis ethanolitolerans* высший биосинтез аминокислот протекал при 35 °C. При более низкой и более высокой температурах чем 35 °C синтез аминокислот вновь понижался.

Найденные величины для оптимального биосинтеза аминокислот соответствовали оптимальным величинам температуры культивирования, установленным для параметров роста испытываемых продукционных культур.

Adámek, L. - Štros, F. - Rut, M. - Rybářová, J.: Die Proteinzusammensetzung der bei erhöhten Temperaturen kultivierten Futterhefen. Kvas. prům., 28, 1982, Nr. 8, S. 174–176.

Bei den auf Mineralboden mit synthetischem Äthanol wachsenden Futterhefeproduzenten *Torulopsis ethanolitolerans* 235 und *Candida utilis* 231 wurde der Einfluss

der Kultivationstemperatur im Bereich von 30 bis 39 °C auf den Gehalt der einzelnen Aminosäuren in dem Protein der Biomasse ermittelt.

Es wurde festgestellt, daß der Aminosäuregehalt in der Hefebiomasse nicht konstant war und sich nach dem angewandten Produktionsstamm und mit den Kultivationsbedingungen änderte.

Die größte Aminosäurenmengen wurde durch den Stamm *Candida utilis* 231 bei der Kultivationstemperatur von 30 °C synthetisiert. Bei höheren Temperaturen wurde eine proportionale Senkung des Aminosäuregehalts in der Biomasse festgestellt.

Bei dem Stamm *Torulopsis ethanolitolerans* 235 verlief die höchste Biosynthese der Aminosäuren bei 35 °C. Bei Temperaturen über/unter 35 °C wurde eine niedrigere Aminosäuresynthese ermittelt.

Die festgestellten Werte für die optimale Biosynthese der Aminosäuren entsprachen den optimalen Werten der Kultivations-Temperaturen, die für die Wachstumsparameter des erprobten Produktionskulturen ermittelt wurden.

**Adámek, L. - Štros, F. - Rut, M. - Rybářová, J.: Protein Content of Fodder Yeasts Grown at Increased Temperature.** Kvas. prům. 28, 1982, No. 8, p. 174—176.

The effect of a culture temperature in a range of 30—39 °C on a content of the individual amino acids in biomass protein was tested with fodder yeasts *Torulopsis ethanolitolerans* 235 and *Candida utilis* 231. Experiments were performed in a mineral medium with synthetic ethanol as a carbon and energy source. It was found that the content of amino acids in biomass was not constant but was changed in dependence of culture conditions and the production strain used. The highest content of amino acids was found in the strain *Candida utilis* 231 at the culture temperature of 30 °C. With increased temperatures the content of amino acids in biomass decreased. With the strain *Torulopsis ethanolitolerans* 235 the highest rate of a synthesis of amino acids was found at 35 °C. At lower and higher temperatures the content of amino acids was decreased again. It was proved that the optimum temperatures for the synthesis of amino acids were identical with those found for the growth rate in both the strains tested.